

## 含有 FXa 切割位点的抗菌肽 X 在大肠杆菌中的融合表达

袁榴娣<sup>1</sup> 窦非<sup>1</sup> 梁玉璞<sup>1</sup> 谢维<sup>2</sup> 王芳<sup>3</sup> 张双全<sup>3</sup> 戴祝英<sup>3</sup>

(南京大学生物化学系 南京大学医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

(南京铁道医学院基础医学系 南京 210009) (南京师范大学生物系 南京 210008)

关键词 抗菌肽 X 融合表达 凝血因子 FXa

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0411-04

抗菌肽是昆虫体液免疫的重要成分<sup>[1,2]</sup>,它们的分子量较小,具有抗菌、抗病毒和杀伤某些肿瘤细胞的功能,而不破坏人体正常细胞。基于它的这种选择性效应和分子小、无抗原性的特点,可望成为新一代的抗菌、抗肿瘤药物。然而,天然抗菌肽来源十分困难,不能满足研究和临床应用的需要,通过基因工程技术生产抗菌肽已成为人们普遍关注的焦点。抗菌肽 CMIV 是从家蚕蛹中分离并测定了其一级结构的新型抗菌肽,它由 35 个氨基酸组成,不含甲硫氨酸,C-末端为酰胺<sup>[3]</sup>。抗菌肽 X 是中国家蚕抗菌肽 CMIV 的变体,其一级结构与天然的抗菌肽 CMIV 相比,在 C 端多了 Asn,有利于在 *E. coli* 中表达出有活性的抗菌肽<sup>[4]</sup>。

抗菌肽 X 能抑制某些肿瘤细胞的生长。为了研究此肽,有必要建立一个能高效表达抗菌肽的表达体系,有学者报道惜古比天蚕素(Cecrobins)A、B 在昆虫细胞中表达<sup>[5,6]</sup>,及惜古比天蚕素 D 在酵母细胞中的表达<sup>[7]</sup>。在 *E. coli* 表达系统中大量以可溶形式表达未有报道。在 *E. coli* 中直接表达抗菌肽可能有困难,即表达产物对宿主菌有杀伤作用。本文通过对抗菌肽基因 X 的 5' 进行改造,引入凝血因子 Xa 的酶切位点,将之克隆到表达载体 pGEX-KG 中,从而在 *E. coli* 中表达出能被正确切割产生有抗菌活性的融合蛋白。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:表达菌株 *E. coli* BL<sub>21</sub> 为本实验室保存,抗菌肽活性检测标准菌 *E. coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 由瑞典斯德哥尔摩大学 Boman 教授惠赠,质粒 pGEX-KG 由南加州大学俞克非博士惠赠。

1.1.2 基因和引物:抗菌肽 X 基因为本实验室人工合成;引物 1 和 2 由上海植生所合成:

引物 1:5' GGGGGAATTCTAATCGAAGGTCGCAGATGGAAAATCTTC 3'

引物 2:5' CCCCCAAGCTTCTAGTTGATGGTAGCAGC 3'

1.1.3 酶及化学试剂:限制酶、DNA 聚合酶 I 大片段、FXa 和 T7DNA 测序试剂盒购自 Promaga 公司 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP 为 Du Pont 公司产品;GST-Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司;T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 分子克隆基本操作技术、PCR、原位杂交,均按分子克隆所述方法进行。

1.2.2 质粒 DNA 的序列测定:采用 Sanger 双脱氧终止法,按试剂盒说明进行。

1.2.3 表达条件及产物的分离纯化:将含重组质粒的大肠杆菌 BL21 于 3 mL 含氨苄青霉素(50  $\mu$ g/mL)的 LB 培养基中培养过夜。次日,按 1:50 接种于含氨苄青霉素(25  $\mu$ g/mL)新鲜 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 2 h,加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L,诱导表达 5 h。8000 r/min 离心 5 min 收集菌体,超声破碎细胞,15000 r/min 离心 10 min,上清经 GST 亲和层析柱,用 PBS(150 mmol/L NaCl,16 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,4 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,pH7.3)洗涤杂蛋白,然后用 pH8.0,50 mmol/L Tris-HCl(含 5 mmol/L L-glutathione)<sup>[8]</sup>洗脱目的蛋白,冷冻干燥后得融合蛋白。

1.2.4 SDS-PAGE 按文献[9]进行,用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.5 Western blotting 分析:参考文献[10],一抗为 GST 多克隆抗体,二抗为 HRP 羊抗鼠 IgG,ECL 试剂显色。

1.2.6 融合蛋白的 FXa 裂解:将融合蛋白溶于 FXa 切割缓冲液中(50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>),加入 FXa,25 $^{\circ}$ C 保温 2 h<sup>[11]</sup>。

1.2.7 抗菌肽的纯化:将切割后的蛋白上 CM-cellulose 柱(2.0 $\times$ 10 cm)用 150 mL 的 0.05 mol/L NH<sub>4</sub>Ac(pH5.1)及 1 mol/L NH<sub>4</sub>Ac(pH5.1)梯度洗脱,将样品走小分子量蛋白电泳<sup>[12]</sup>,考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.8 测活:参照文献[13]的方法。

## 2 结 果

### 2.1 重组型质粒 pGEX-FXa-X 的构建与筛选

抗菌肽 X 基因经 PCR 扩增,在其 5' 端产生 FXa 的酶切位点。用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切后,将含有 FXa 酶切位点的

X 基因片段插入 pGEX-KG 的 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切位点之间,位于 GST 的 3' 末端,阅读框架不变,构成在 GST 启动子 *P*<sub>tac</sub> 控制下的重组质粒 pGEX-FXa-X。图 1 为 pGEX-FXa-X 重组质粒的构建过程。连接产物转化 DH5 $\alpha$ ,经原位杂交法筛选,得到阳性重组质粒 pGEX-FXa-X。

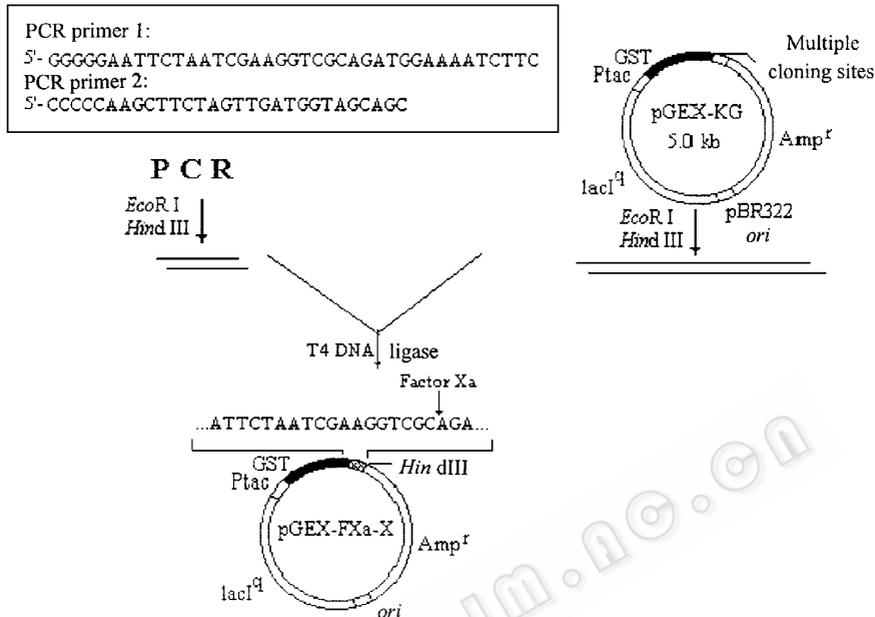


图 1 表达质粒 pGEX-FXa-X 的构建

Abbreviation :*P*<sub>tac</sub> ,tac promoter ;ATG ,translational start coden ;TAG ,translational termination coden. V ,pUC9 vector

### 2.2 抗菌肽 X 基因的表达

重组的表达质粒转化大肠杆菌 BL21,挑选阳性转化子。阳性转化子经 IPTG 诱导,*P*<sub>tac</sub> 启动子启动下表达。经 SDS-PAGE 鉴定的结果示于图 2 中,凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色,GST-X 的表达量约占细胞总蛋白的 20%,重组蛋白以可溶的形式存在。

### 2.3 Western blotting

免疫印迹结果表明(图 3),31 kD 处的蛋白条带可与抗 GST 抗体结合,切割后结合条带移至 27 kD 处。

### 2.4 抗菌肽的纯化

切割后的蛋白经 CM-纤维素柱纯化,第一个洗脱峰为重组抗菌肽。样品经小分子量电泳检测,在 4 kD 处有单一条带(图 4)。

### 2.5 抗菌肽的活性检测

GST-X 融合蛋白,FXa 切割后的 GST-X 和 FXa 切割缓冲液抗菌活性见图 5,其中只有 FXa 切割后的 GST-X 有抗菌活性。

## 3 讨 论

由于抗菌肽的强大而广谱的抗菌能力,而且产物易于降解,故不可能直接在细菌体系中表达抗菌肽<sup>[3]</sup>。本文通过融合表达的方式将化学合成的抗菌肽基因 X 克隆到 *E. coli*

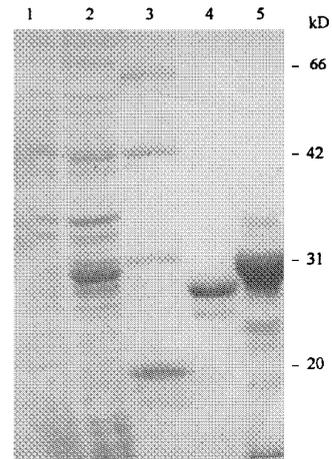


图 2 *E. coli* BL21 表达的蛋白 GST-X 的 SDS-PAGE 电泳分析

Samples were electrophoresed on a polyacrylamide gel, which was stained with Coomassie Brilliant Blue R250, and the expression levels were measured by densitomerery. Lane1. pGEX-Fxa-X in BL21 (DE3) without IPTG ;Lane2. pGEX-FXa-X in BL21( DE3 )with IPTG( 0.2 mmol/L );Lane3. Protein molecular weight marker ; Lane4. The large fragment of fusion protein after digested by FXa ; Lane5. Purified fusion protein after affinity chromatography. im. ac. cn

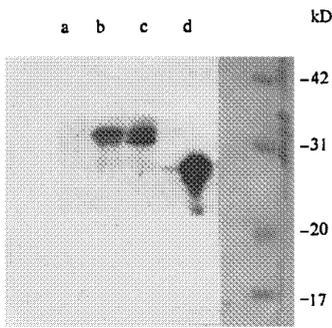


图3 Western 杂交分析

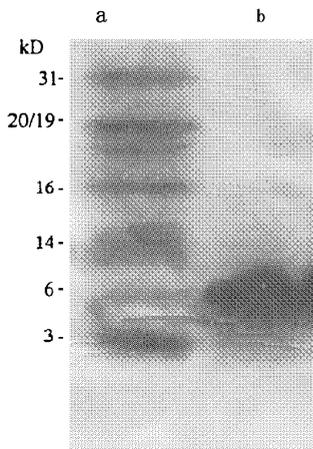


图4 离子交换纯析的洗脱液的 SDS-PAGE 电泳

a. Low molecular weight protein marker b. Purified cecropin

中,表达获得了融合蛋白,并通过 FXa 裂解获得了抗菌活性的产物。

现在有许多载体用来在细菌中快速而有效地表达重组蛋白,我们采用 pGEX-KG 融合表达载体。pGEX-KG 是近年来发展起来的一类用于表达真核蛋白的载体,它能在 P<sub>tac</sub> 启动子控制下表达谷胱甘肽转移酶(GST),将抗菌肽基因 X 与 GST 基因融合,转化到 *E. coli* BL21,获得了融合表达,融合产物主要以可溶状态存在于菌体中,不形成包涵体,易于纯化,这是产业化的基础。而且,pGEX-KG 载体在 GST 基因后插入 5~6 个甘氨酸,这一片段能增强蛋白酶的水解能力,便于蛋白酶切割融合产物的效率,以利于纯化蛋白。表达产物经 GST 亲和纯析柱后,收集到融合蛋白。用 FXa 裂解,裂解产物显示了抑制 *E. coli* K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> 生长的活性。

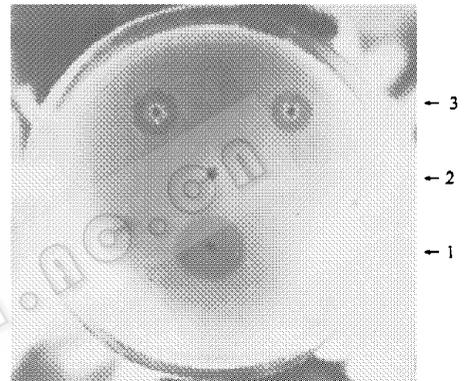


图5 抑菌分析

1. Control (factor Xa digestion buffer);  
2. Cecropin CMIV 3. GST-X digested by factor Xa

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A *et al.* *Nature*, 1981, **292**: 246~248.
- [ 2 ] Boman H, Hultmark D. *Annu Rev Microbiol*, 1987, **41**: 103~126
- [ 3 ] 张双全, 屈贤铭, 戚正武等. *生物化学杂志*, 1987, **3**(1): 11~18
- [ 4 ] Xie W, Qiu Q F, Wu H H *et al.* *Biochemistry and Molecular Biology International* 1997, **46**(39): 487~492
- [ 5 ] Hellers M, Gunne H, Steiner H. *Eur J Biochem*, 1991, **199**: 435~439
- [ 6 ] Andersons D, Engstrom A, Josephson S. *J Biochem*, 1991, **280**: 219~224
- [ 7 ] 马礼经, 庄楚雄, 黄自然. *蚕业学报*, 1995, **21**: 43~46
- [ 8 ] Smith D B, Johnson K S. *Gene*, 1988, **67**: 31~40
- [ 9 ] Chang J Y. *Eur J Biochem*, 1985, **151**: 217~224
- [ 10 ] Sambrook J, Fritish E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 11 ] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H. *Eur J Biochem*, 1982, **127**: 207~217
- [ 12 ] Hermann Schagger, Gerbhard Von Jagow, *Anal Biochem*, 1987, **160**: 368~379
- [ 13 ] 谢维, 丘奇峰, 陈江宁等. *南京大学学报(自然科学版)*, 1996, **32**(3): 474~477

## Fusion Expression of Cecropin X Including the Cleavage of FXa in *Escherichia coli*

YUAN Liu-Di DOU Fei LIANG Yu-Pu

(*Department of Biochemistry and State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology ,  
Nanjing University ,Nanjing 210093*)

XIE Wei

(*Ministerial Opening Laboratory of Molecular Biology ,Nanjing Railway Medical college ,Nanjing 210009*)

WANG Fang ZHANG Shuang-Quan DAI Zhu-Ying

(*Department of Biology ,Nanjing Normal University ,Nanjing 210008*)

**Abstract** PCR method was used to introduce the code sequence of Factor Xa cleavage site to the 5' end of cecropin CMIV mutant gene X ,then the gene was cloned into the expression vector pGEX-KG ,and was highly expressed in *E. coli* BL21 by IPTG induction. The fusion protein was purified by affinity-chromatography and was cleaved by Factor Xa. Cecropin X with antibacterial activity was obtained after purified by ion-exchange chromatography.

**Key words** Cecropin X ,fusion expression ,Factor Xa